

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C12Q 1/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/58502</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 5. Oktober 2000 (05.10.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE00/00881 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 24. März 2000 (24.03.00) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 199 13 428.6      25. März 1999 (25.03.99)      DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> <u>WERNICKE</u> , Dirk [DE/DE]; Hallandstrasse 14, D-13189 Berlin (DE). <u>GROMNICA-IHLE</u> , Erika [DE/DE]; Kavalierstrasse 15, D-13187 Berlin (DE). <u>FREUDIGER</u> , Dirk [DE/DE]; Platanenstrasse 11, D-13156 Berlin (DE). <u>SCHULZE WESTHOFF</u> , Claudia [DE/DE]; Weichselstrasse 56, D-12045 Berlin (DE). <b>(74) Anwalt:</b> BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(54) Title:</b> USE OF COLLAGENASE 3 FOR DETECTING DESTRUCTIVE DISEASES OF THE JOINTS, ESPECIALLY FOR PROGNOSING THE PROGRESSION OF THE DISEASE AND THE GENETIC PREDISPOSITION FOR RHEUMATOID ARTHRITIS  <b>(54) Bezeichnung:</b> VERWENDUNG VON KOLLAGENASE 3 ZUM NACHWEIS VON DESTRUKTIVEN GELENKERKRANKUNGEN, INSBESONDERE ZUR PROGNOSE DES KRANKHEITSVERLAUFS UND ZUR GENETISCHEN PRÄDISPOSITION DER RHEUMATOIDEN ARTHRITIS (RA)  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to the use of collagenase 3 for detecting destructive diseases of the joints, especially for prognosing the progression of the disease and the genetic predisposition for rheumatoid arthritis.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von Kollagenase 3 zum Nachweis von destruktiven Gelenkerkrankungen, insbeseondere zur Prognose des Krankheitsverlaufs und zur genetischen Prädisposition der Rheumatoiden Arthritis (RA).</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Verwendung von Kollagenase 3 zum Nachweis von destruktiven Gelenkerkrankungen, insbesondere zur Prognose des Krankheitsverlaufs und zur genetischen Prädisposition der Rheumatoiden Arthritis (RA)**

**Beschreibung**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Kollagenase 3 zum Nachweis von destruktiven Gelenkerkrankungen, insbesondere zur Prognose des Krankheitsverlaufs und zur genetischen Prädisposition der Rheumatoiden Arthritis (RA).

Die RA ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, vordergründig der Gelenke. Die Ätiologie der Erkrankung sowie relevante pathogenetische Mechanismen sind bis heute unbekannt. Als chronische Erkrankung sind die Patienten von dieser über Jahre bzw. Jahrzehnte betroffen. Der Verlauf der Erkrankung ist sehr heterogen, über die Jahre bzw. Jahrzehnte wechselhaft und bisher nicht prognostizierbar. Eine frühzeitige angemessene Prognosestellung über den zu erwartenden Verlauf der Erkrankung bzw. das rechtzeitige Erkennen des Beginns eines schwereren Krankheitsverlaufes ist für den Patienten und den behandelnden Arzt von großer Wichtigkeit, um die bisher nicht heilbare chronische Erkrankung wenigstens in den Frühstadien effizient zu behandeln und somit ein Fortschreiten möglichst frühzeitig zu bremsen bzw. aufzuhalten. Das betrifft insbesondere das Aufhalten des Prozesses der progredienten Knorpel- und Knochendestruktion.

Gegenwärtig zur Verfügung stehende medikamentöse Therapien sind wirksam, allerdings oft auch mit gravierenden Nebenwirkungen verbunden. Das hängt sowohl mit dem Wirkungsmechanismus der Medikamente selbst zusammen, ihrer gleichzeitigen kombinierten Gabe, und der Notwendigkeit einer lebenslänglichen Therapie über Jahre und Jahrzehnte. Zum Einsatz kommen gegenwärtig Kombinationstherapien aus

- (a) Steroidpräparaten
- (b) Immunsuppressiva und Zytostatika, sogenannte disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD, sogenannte Basistherapeutika) sowie
- (c) nicht-steroidalen antientzündlichen Medikamenten.

### Zur Heterogenität und Pathogenese der RA

Die RA ist eine chronisch entzündliche Erkrankung von hoher Heterogenität, welche das Krankheitsmuster, die Ansprechbarkeit auf therapeutische Maßnahmen (internistische und chirurgische) und die Prognose der Erkrankung betrifft. Die klinische Heterogenität ist mit einer Vielzahl histopathologischer Veränderungen in der Synovialmembran der betroffenen Gelenke verbunden. Diese klinische und histopathologische Heterogenität der Erkrankung, verbunden mit unzureichenden Kenntnissen über Ätiologie und relevante pathogenetische Mechanismen, führen bisher zu sehr unzureichenden Behandlungsergebnissen von RA Patienten. Innerhalb der ersten beiden Jahre nach Erkrankungsbeginn müssen etwa ein Drittel der RA Patienten ihre Berufstätigkeit aufgeben. In internistisch-rheumatologischen Kliniken beträgt der Anteil der RA Patienten über 50%, in den Einrichtungen der orthopädischen Rheumatologie sogar ca. 75%. Überdurchschnittlich hoch sind die Ausgaben für medikamentöse Langzeittherapien und stationäre Heilmaßnahmen. Die Prävalenz der Erkrankung beträgt ca. 1% in der Gesamtbevölkerung.

Die pathogenetischen Mechanismen in den betroffenen Gelenken schließen eine chronische Entzündung, eine abnormale Immunantwort sowie eine Hyperplasie der Synovialmembran ein. Die chronisch entzündliche und hyperplastische Synovialmembran wächst invasiv in angrenzende Knorpel- und Knochenstrukturen ein und führt damit zu einer progredienten Gelenkdestruktion. Das klinische Endstadium der Erkrankung wird maßgeblich durch die Knorpel- und Knochendestruktion bestimmt, welche zu Funktionsverlust der Gelenke und Invalidität führen. Allerdings hat die gegenwärtig im Vordergrund stehende antientzündliche Therapie nur wenig Einfluß auf das Voranschreiten der Knorpel- und Knochendestruktion. Es gibt Anhaltspunkte dafür, daß chronische Entzündung und progrediente Knorpel- und Knochendestruktion eher als zwei separate pathogenetische Mechanismen in einem gemeinsamen Krankheitsgeschehen zu betrachten sind.

Bisher zur Verfügung stehende bzw. bekannte prognostische Marker für den Verlauf der RA

- (1) Die z.Z. sichersten und in der klinischen Praxis routinemäßig genutzten Marker für den Verlauf der RA sind systemische Entzündungsparameter, wie die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG), vor allem das C-reaktive Protein (CRP) und, mit Einschränkungen, andere Akute-Phase-Proteine. Diese Parameter korrelieren am besten mit dem aktuellen akuten Entzündungsgeschehen im Organismus und sind die maßgeblichen Parameter für eine antientzündliche Therapie. Da pathogenetisch die systemische chronische Entzündung und die progrediente Gelenkdestruktion nur bedingt in einem Zusammenhang stehen, ist die Aussagekraft dieser Parameter für die Prognose und den Verlauf der Erkrankung insgesamt, sowie für die progrediente Knorpel- und Knochendestruktion im besonderen, sehr eingeschränkt.
- (2) Das Vorliegen eines positiven Rheumafaktors wird als Indikator für eine gestörte Immunantwort gewertet. Er ist jedoch nicht spezifisch für die RA und der Aussagewert für den Verlauf der Erkrankung ist eingeschränkt.
- (3) Es ist weiterhin bekannt, daß bestimmte Muster von Antigenen, die an der Zelloberfläche von Lymphozyten und anderen Gewebszellen nachgewiesen werden können (sogenannte HLA-Antigene), mit schwereren Verläufen der RA assoziiert sein können. Wegen der Vielfalt der HLA-Antigene und ihrer unterschiedlichen epidemiologischen Verteilung sind Aussagen zur Prognose der RA nur sehr eingeschränkt möglich. Korrelationen zur progredienten Gelenkdestruktion konnten nicht gefunden werden.

Verlässliche prognostische Marker der Erkrankung sind somit entscheidend für eine frühzeitig einsetzende adäquate medikamentöse Therapie und die Rechtfertigung einer solchen bezüglich der einzukalkulierenden Nebenwirkungen.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, entsprechende verlässliche Parameter zu finden und entsprechende Marker bereitzustellen, die insbesondere für RA geeignet sind.

Die Erfindung beruht auf der Erkenntnis, daß Kollagenase 3 am Prozeß der progredienten Knorpel- und Knochendestruktion beteiligt ist. Für die progrediente Knorpel- und Knochendestruktion bei RA sind unterschiedliche Proteasen, vor allem jedoch die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) verantwortlich, welche zur Spaltung unterschiedlicher Komponenten der extrazellulären Matrix befähigt sind. Kollagenase 3 als ein Vertreter der MMP-Familie ist für die Knorpel- und Knochendestruktion bei destruktiven Gelenkerkrankungen, wie der RA, von besonderem Interesse. Zum einen besitzt Kollagenase 3 im Vergleich zu anderen Kollagenasen und weiteren MMP eine hohe katalytische Aktivität gegenüber Kollagen-Typ II, dem Hauptkollagenbestandteil des hyalinen Knorpels, und spaltet ein breites Spektrum anderer Bestandteile der extrazellulären Matrix mit hoher Effizienz. Zum anderen konnte gezeigt werden, daß Kollagenase 3 in adulten menschlichen Geweben nur unter pathologischen Bedingungen nachweisbar ist, wie beim Wachstum maligner Tumoren, in chronischen Wunden, sowie im arthrotischen Knorpel und in der Synovialmembran bei RA. Es kann somit davon ausgegangen werden, daß aufgrund der Substratspezifität und des Expressionsmusters von Kollagenase 3, dieser MMP eine maßgebliche Rolle bei der progredienten Knorpel- und Knochendestruktion, insbesondere auch bei RA, zukommt.

In der Synovialflüssigkeit von RA Patienten konnte die erhöhte Konzentration von verschiedenen MMP nachgewiesen werden. Nur für Stromelysin 1 wurde jedoch eine Korrelation zu systemischen Entzündungsparametern, wie BSG und CRP, gezeigt. Darüber hinaus konnte keine Korrelation zwischen der kollagenolytischen Aktivität in der Synovialflüssigkeit und dem Grad der Knorpel- und Knochendestruktion nachgewiesen werden.

Erfindungsgemäß wird Kollagenase 3 als prognostischer Marker bei destruktiven Gelenkerkrankungen, vorzugsweise zum Nachweis für einen Verlauf der RA verwendet.

In Anbetracht des chronischen und wechselhaften Verlaufs der Erkrankung dient die Bestimmung von Kollagenase 3 sowohl der Prognosestellung bei der Erstdiagnosestellung, als auch der Verlaufskontrolle der Erkrankung, um u.a. den Beginn

aktiverer Krankheitsphasen frühzeitig zu erkennen. Unter schwereren Verläufen bzw. aktiveren Krankheitsphasen der RA werden sowohl eine höhere Entzündungsaktivität der Patienten (gemessen vor allem an den systemischen Entzündungsparametern BSG und CRP) als auch, und das in diesem Fall insbesondere, eine schnellere, d.h. progredientere Knorpel- und Knochendestruktion (gemessen u.a. durch die radiologische Bestimmung des Larsen-Indexes, MRT-Messungen etc.) verstanden.

Kollagenase 3 wird dazu sowohl in Geweben (Synovialmembranpräparate, Knorpel- und Knochenpräparate, Präparate der Synovialmembran-Knorpelgrenze, gewonnen bei Synovektomien, künstlichem Gelenkersatz u.a. operativen Eingriffen sowie durch Biopsien) und in Körperflüssigkeiten (Synovialflüssigkeit, Blut) bestimmt.

Bevorzugt werden folgende Bestimmungen von Kollagenase 3 durchgeführt:

- (a) qualitative und quantitative Bestimmung der mRNA Expression, u.a. durch reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)-Analyse, Northern Blot-Analyse,
- (b) qualitative und quantitative Bestimmung von Kollagenase 3 - Antigen (sowohl als Proenzym wie auch als aktivierte Form), u.a. durch Western Blot-Analyse, immunologische Nachweisverfahren etc.,
- (c) Nachweis der katalytischen Aktivität der aktivierten Kollagenase 3, u.a. durch Zymographie, den Nachweis spezifischer Peptidsplaltprodukte etc.,
- (d) Nachweis eines gestörten quantitativen Verhältnisses zwischen Kollagenase 3 und deren spezifischen (gewebespezifischen Inhibitoren von MMP) bzw. unspezifischen Inhibitoren ( $\alpha_2$ -Makroglobulin etc.) durch Bestimmung von freiem und in Komplexen mit Inhibitoren gebundenem Kollagenase 3 - Protein, u.a. durch Western Blot-Analyse, immunologische Nachweisverfahren etc.
- (e) Nachweis von Kollagenase 3 mRNA bzw. Antigen in histologischen Präparaten der Synovialmembran-Knorpel-Grenzschicht, u.a. durch in situ Hybridisierung bzw. Immunohistochemie.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung dient Kollagenase 3 außerdem als ein potentieller Marker für eine genetische Prädisposition der Erkrankung.

Kollagenase 3 kann sowohl als einziger Marker dienen, als aber auch in Kombination mit anderen Markern ausgewertet werden. Weitere Marker können solche sein, von denen entweder eine genetische Prädisposition bekannt ist oder vermutet wird, oder von denen zumindest bekannt ist, daß sie häufiger mit schwereren Verläufen der Erkrankung assoziiert sind (wie z.B. bestimmte Muster von HLA-Antigenen, wie dem HLA-DR4, oder dem Rheumafaktor) eingesetzt werden.

In Kombination mit anderen Markern erhöht sich der prognostische Aussagewert sowohl für den Verlauf der Erkrankung, insbesondere unter dem Aspekt der progredienten Knorpel- und Knochendestruktion, als auch für die genetische Prädisposition, bzw. kann einen Stellenwert annehmen, der für die klinische Praxis relevant wird.

Es wurde außerdem festgestellt, daß Kollagenase 3 Proenzym durch MT1-MMP und/oder Gelatinase A aktiviert wird. Zeitgleich zur mRNA Expression von Kollagenase 3 in Synovialmembranpräparaten von Patienten mit RA geht nämlich in fast allen Fällen eine mRNA Koexpression dieser zwei anderen MMP, der Membran-Typ I MMP (MT1-MMP) und der Gelatinase A (MMP-2), einher. MT1-MMP und Gelatinase A stellen durch eine Bestimmung ihrer mRNA- oder Proteinexpression, deren Höhe und Lokalisation, bzw. deren katalytische Aktivität in Geweben bzw. Körperflüssigkeiten, wie für Kollagenase erfolgt, in Kombination mit Kollagenase 3 prognostische Marker für RA dar.

Die Erfindung wird anschließend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

## **Ergebnisse**

### Patienten

Es wurden 36 Patienten mit gesicherter Diagnose einer RA in Übereinstimmung mit den Diagnosekriterien der American Rheumatism Association von 1987 in die Untersuchungen einbezogen. Die Patienten wurden klinisch und paraklinisch untersucht. Bei allen Patienten waren die Handgelenke von der Erkrankung mitbetroffen. Bei den in die Untersuchungen einbezogenen Patienten war ein rheumachirurgischer Eingriff zur



Entfernung der entzündlichen und hyperplastischen Synovialmembran (sogenannte Synovektomie) in jeweils einem der Handgelenke erforderlich, um ein Fortschreiten der Gelenkdestruktion aufzuhalten und die Bewegungsfähigkeit des Gelenkes zu verbessern. Das chirurgisch entfernte Material wurde sowohl histopathologisch begutachtet als auch zur Präparation von mRNA verwendet. Die Patienten wurden in der Rheumaklinik Berlin-Buch internistisch betreut und in der Orthopädischen Klinik des Klinikums Berlin-Buch operiert.

#### mRNA Expression von Kollagenase 3 in den Synovialmembranpräparaten

Die mRNA Expression von Kollagenase 3 wurde in den Synovialmembranpräparaten von allen 36 Patienten mittels Northern Blot-Analyse untersucht (Abb. 1). Dabei wiesen 21 Präparate (60%) eine mRNA Expression von Kollagenase 3 auf. Im Unterschied dazu ist bekannt, daß die mRNA Expression von anderen MMP, wie interstitielle Kollagenase und Stromelysin 1, in allen Synovialmembranpräparaten nachweisbar ist (in Abb. 1 nur gezeigt für interstitielle Kollagenase). Die Ergebnisse der Northern Blot Analyse wurden durch Untersuchungen mit der Methode der RT-PCR bestätigt. Es wurde weiterhin gefunden, daß eine mRNA Expression von Kollagenase 3 in Synovialmembranpräparaten von Patienten mit RA in fast allen Fällen mit einer mRNA Koexpression von zwei anderen MMP, der Membran-Typ I MMP (MT1-MMP) und von Gelatinase A (MMP-2), einhergeht. Falls in Abwesenheit einer Kollagenase 3 mRNA Expression eine mRNA Expression von MT1-MMP und Gelatinase A nachzuweisen war, so war deren Expressionshöhe in der Mehrzahl der Fälle deutlich geringer als bei einer Koexpression mit Kollagenase 3 mRNA. Diese Ergebnisse wurden durch Northern Blot-Analyse und mit der Methode der RT-PCR erhalten (Ergebnisse hier nicht gezeigt).

In der Abbildung 1 ist ein repräsentativer Northern Blot mit Synovialmembranpräparaten von 6 Patienten mit RA gezeigt. Aufgetragen wurden jeweils 25 µl totale RNA. Im Unterschied zu interstitieller Kollagenase, welche in allen Patienten exprimiert wird, ist eine mRNA Expression von Kollagenase 3 nur bei einem Teil der RA Patienten nachweisbar. Humane Gyceraldehyd-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) dient als Kontrolle für da Auftragen äquivalenter RNA-Mengen.

Klinische und paraklinische Parameter

Aus Tab. 1 ist ersichtlich, daß Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran signifikant erhöhte systemische Entzündungsmarker BSG ( $p < 0.05$ ) und CRP ( $p < 0.005$ ) aufweisen. Keine Unterschiede bestehen zwischen beiden Patientengruppen bezüglich des Rheumafaktors sowie im Differenzialblutbild.

Der Grad der Knorpel- und Knochendestruktion wurde radiologisch mittels Larsen-Index bestimmt, indem Röntgenaufnahmen der Hände, Handgelenke und Vorfüße ausgewertet wurden. Dabei ließ sich zwar einerseits kein signifikanter Unterschied im Grad der Knorpel- und Knochendestruktion zwischen beiden Patientengruppen in Anbetracht des kleinen Patientenkollektivs nachweisen. Andererseits war auffällig, daß in der Patientengruppe mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran 5 Patienten (24%) einen Krankheitsverlauf von weniger als 2 Jahren hatten und ausgeprägte radiologische Veränderungen aufwiesen, wohingegen in der Patientengruppe ohne Kollagenase 3 mRNA Expression nur ein Patient (7%) weniger als 2 Jahre erkrankt war. Außerdem hatten in der Patientengruppe mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran 6 Patienten (29%) vorangegangene rheumachirurgische Eingriffe im Gegensatz zu nur 2 Patienten (14%) in der Patientengruppe ohne Kollagenase 3 mRNA Expression.

Somit weisen Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran eine höhere systemische Entzündungsaktivität auf und werden zu einem früheren Zeitpunkt rheumachirurgischen Eingriffen zugeführt (letzteres hängt mit einem schwereren Krankheitsverlauf zusammen und/oder mit einer geringeren Ansprechbarkeit auf medikamentöse Therapien – zum zweiten siehe nächster Punkt) als Patienten ohne Kollagenase 3 mRNA Expression.

Tab. 1. Klinische und paraklinische Parameter von RA Patienten in Abhängigkeit von der Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran

Parameter	Kollagenase 3 mRNA Expression		Statistische Analyse
	ohne	mit	
Alter	59.6 ± 5.6 (von 32 bis 81)	58.6 ± 4.9 (von 28 bis 83)	n.s.
Geschlecht (m/w)	3/12	3/18	n.s.
Erkrankungsdauer (Jahre)	11.3 ± 3.1	10.9 ± 1.8	n.s.
Hämoglobin	8.3 ± 0.4	7.8 ± 0.3	n.s.
Leukozytenzahl	9.3 ± 1.1	10.3 ± 0.7	n.s.
BSG (mm/h)	27.0 ± 5.0	39.0 ± 5.4	p < 0.05
CRP (mg/l)	9.2 ± 2.7	30.9 ± 6.0	P < 0.005
Rheumafaktor positiv/ Patientenzahl (%)	9/15 (60%)	14/21 (66%)	n.s.

### Medikamentöse Therapie

Entsprechend der höheren systemischen Entzündungsaktivität bei Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran wurden diese häufiger mit Prednisolon behandelt (Abb. 2A). Darüber hinaus erhielten zum Zeitpunkt der Synovektomie 15 Patienten (71%) mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran mindestens 5 mg/ml Prednisolon im Vergleich zu 7 Patienten (47%) ohne Kollagenase 3 mRNA Expression. Die Therapie mit DMARD wurde bei den Patienten als Monotherapie durchgeführt. DMARD wurden in folgender Reihenfolge (entspricht der Aggressivität ihrer Wirkung) verschrieben und gewechselt: Chloroquin (250mg/d), Sulfasalazin (2g/d), Methotrexat (15-20 mg/Woche), Gold-Natriumthiomalat (50 mg/Woche) und Azathioprin (2mg/kg/d). Wie in Abb. 2A gezeigt, wurden Patienten

mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran häufiger mit DMARD behandelt. Außerdem mußten die DMARD bei Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran öfter wegen fehlender Wirkung gewechselt werden (Abb. 2B). In beiden Patientengruppen mußte das DMARD bei jeweils zwei Patienten darüber hinaus wegen Nebenwirkungen gewechselt werden.

Somit wurden Patienten mit Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran aggressiver medikamentös behandelt und wiesen eine schlechtere Ansprechbarkeit auf eine wirksame medikamentöse Therapie auf. Letzteres führte möglicherweise auch zu einer frühzeitigeren Einweisung zu einem rheumachirurgischen Eingriff.

#### Rheumatologische Familienanamnese bezüglich RA

In der Kollagenase 3 - positiven Patientengruppe weisen zehn von 19 Patienten (48%) eine positive Familienanamnese auf. In der Patientengruppe ohne Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran waren dagegen nur in drei von 14 Fällen (20%) Familienangehörige an RA erkrankt (Abb. 3). Von insgesamt drei Patienten konnten keine Angaben erhoben werden. Auffällig ist somit die Häufung einer positiven Familienanamnese in der Patientengruppe mit einer Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran.

### Patentansprüche

1. Verwendung von Kollagenase 3 als prognostischer klinischer Marker zum Nachweis destruktiver Gelenkerkrankungen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Kollagenase 3 zur Prognose des Verlaufs von Rheumatoider Arthritis (RA) dient.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Kollagenase 3 mRNA Expression quantitativ und qualitativ bestimmt wird.
4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Kollagenase 3 -Antigen, sowohl als Proenzym als auch als aktivierte Form, quantitativ und qualitativ bestimmt wird.
5. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die katalytische Aktivität der aktivierten Kollagenase 3 nachgewiesen wird.
6. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die quantitativen Verhältnisse zwischen Kollagenase 3 und deren spezifischen bzw. unspezifischen Inhibitoren durch Bestimmung von freiem und in Komplexen mit Inhibitoren gebundenem Kollagenase 3-Protein bestimmt und verglichen werden.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis in Geweben und Körperflüssigkeiten erfolgt.
8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Gewebe Synovialmembranpräparate, Knorpel- und Knochenpräparate oder Präparate der Synovialmembran-Knorpelgrenze, gewonnen bei Synovektomien, künstlichem Gelenkersatz u.a. operativen Eingriffen sowie durch Biopsien, verwendet werden.

9. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß als Körperflüssigkeiten Synovialflüssigkeit oder Blut verwendet werden.
10. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Kollagenase 3 zum Nachweis einer erhöhten genetischen Prädisposition der Rheumatoiden Arthritis (RA) dient.
11. Verwendung zur Erhöhung der klinischen Relevanz der Aussagefähigkeit nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß neben Kollagenase 3 weitere Marker, wie z.B. HLA-Antigene zum Nachweis eines schwereren Verlaufes von RA, bzw. Marker, wie z.B. bestimmte Muster von HLA-Antigenen zum Nachweis einer erhöhten genetischen Prädisposition, eingesetzt werden.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß neben Kollagenase 3 zusätzlich MT1-MMP und/oder Gelatinase A als prognostische Marker durch Bestimmung ihrer mRNA- oder Proteinexpression, deren Höhe und Lokalisation, bzw. deren katalytische Aktivität in Geweben bzw. Körperflüssigkeiten dienen.

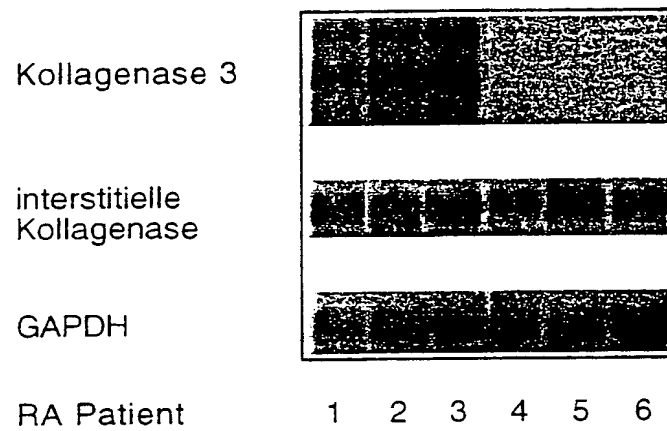


Abb. 1 Northern Blot-Analyse von Kollagenase 3 in Synovialmembranpräparaten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis



•

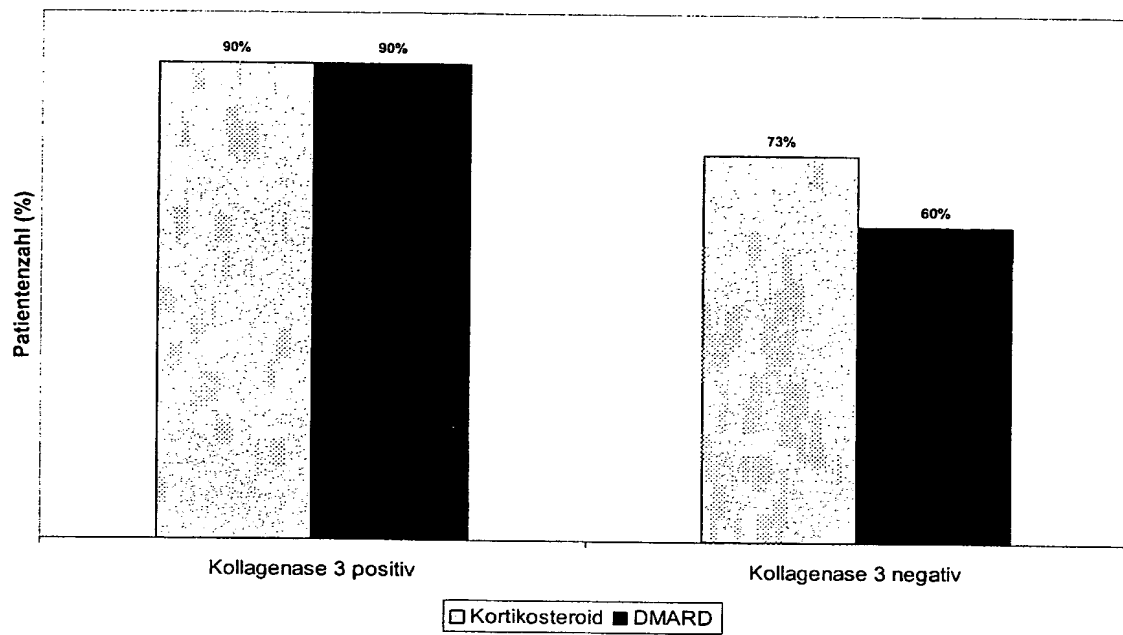
•

•

•



A



B

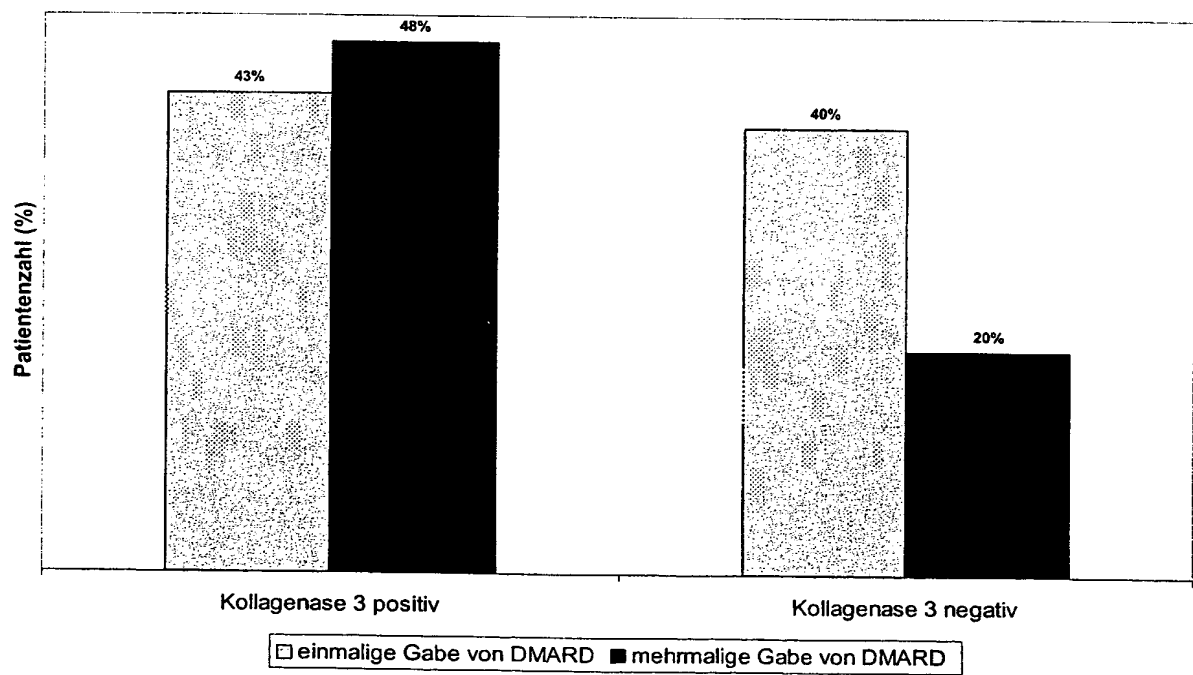


Abb. 2 Medikamentöse Therapie



10

11

12

13

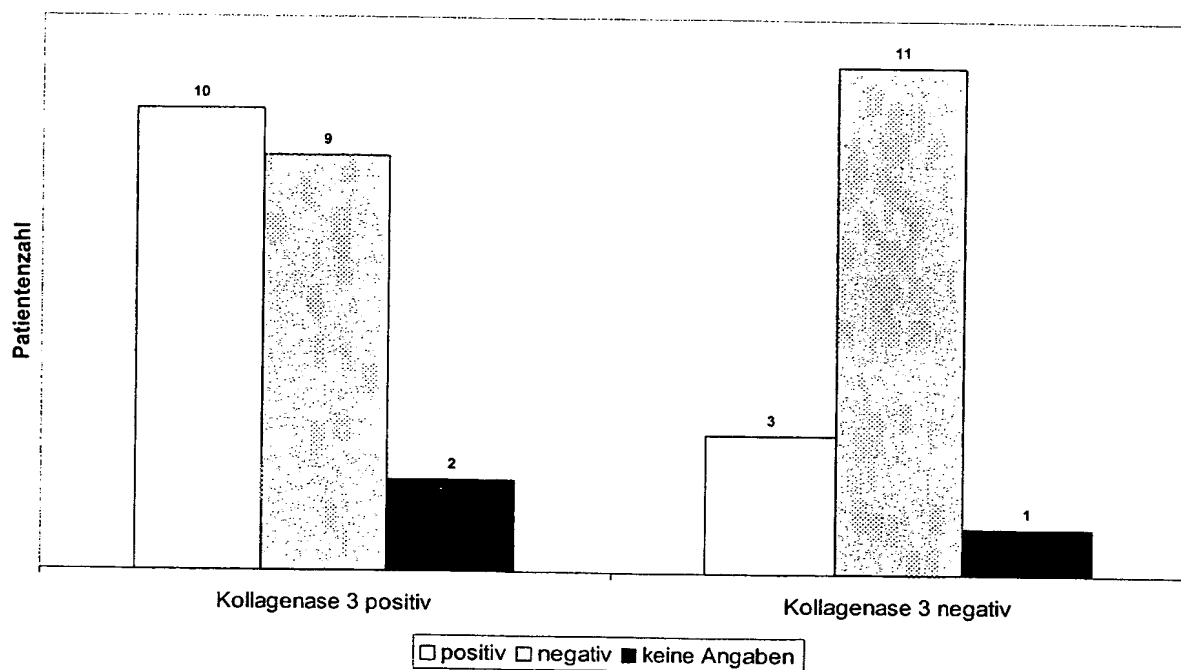


Abb. 3 Familienanamnese bezüglich RA in Abhängigkeit von einer Kollagenase 3 mRNA Expression in der Synovialmembran



1

2

3

4

5

NC

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>G01N 33/564, 33/573, 33/68, A61K</b> <b>38/48, C07K 16/40, C12Q 1/37</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/58502</b>  <b>(43) Internationales</b> <b>Veröffentlichungsdatum:</b> 5. Oktober 2000 (05.10.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE00/00881 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 24. März 2000 (24.03.00)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 199 13 428.6      25. März 1999 (25.03.99)      DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> WERNICKE, Dirk [DE/DE]; Hallandstrasse 14, D-13189 Berlin (DE). GROMNICA-IHLE, Erika [DE/DE]; Kavaliierstrasse 15, D-13187 Berlin (DE). FREUDIGER, Dirk [DE/DE]; Platanenstrasse 11, D-13156 Berlin (DE). SCHULZE WESTHOFF, Claudia [DE/DE]; Weichselstrasse 56, D-12045 Berlin (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>  <b>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-</b> <b>richts:</b> 16. November 2000 (16.11.00)	
<b>(54) Title: USE OF COLLAGENASE 3 FOR DETECTING DESTRUCTIVE DISEASES OF THE JOINTS</b>  <b>(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON KOLLAGENASE 3 ZUM NACHWEIS VON DESTRUKTIVEN GELENKERKRANKUN-</b> <b>GEN</b>  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to the use of collagenase 3 for detecting destructive diseases of the joints, especially for prognosing the progression of the disease and the genetic predisposition for rheumatoid arthritis.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung betrifft die Verwendung von Kollagenase 3 zum Nachweis von destruktiven Gelenkerkrankungen, insbeseondere zur Prognose des Krankheitsverlaufs und zur genetischen Prädisposition der Rheumatoiden Arthritis (RA).</p>		

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/DE 00/00881

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/564 G01N33/573 G01N33/68 A61K38/48 C07K16/40  
C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N A61K C07K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 29560 A (FUJI YAKUHHN KK) 9 July 1998 (1998-07-09) abstract ---	1-12
X	MEDLINE, Washington DC USA; abstract no. 96280152, abstract XP002145943 & D. WERNICKE ET AL. : "Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis" JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, vol. 23, no. 4, 1996, pages 590-595, Montreal Canada -----	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 August 2000

Date of mailing of the international search report

26/09/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/00881

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9829560 A	09-07-1998	NONE	



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. ationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00881

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/564 G01N33/573 G01N33/68 A61K38/48 C07K16/40  
C12Q1/37

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N A61K C07K C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 29560 A (FUJI YAKUHI KK) 9. Juli 1998 (1998-07-09) Zusammenfassung	1-12
X	MEDLINE, Washington DC USA; Zusammenfassung no. 96280152, Zusammenfassung XP002145943 & D. WERNICKE ET AL. : "Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis" JOURNAL OF RHEUMATOLOGY, Bd. 23, Nr. 4, 1996, Seiten 590-595, Montreal Canada	1-12

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. August 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

26/09/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Van Bohemen, C

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/00881

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9829560      A	09-07-1998	KEINE	